



18 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 Übersetzung der  
europäischen Patentschrift

97 EP 0 636 886 B 1

10 DE 694 25 709 T 2

51 Int. Cl.<sup>7</sup>:  
G 01 N 33/96  
G 01 N 33/68

- 21 Deutsches Aktenzeichen: 694 25 709.5  
98 Europäisches Aktenzeichen: 94 201 876.3  
96 Europäischer Anmeldetag: 29. 6. 1994  
97 Erstveröffentlichung durch das EPA: 1. 2. 1995  
97 Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: 30. 8. 2000  
47 Veröffentlichungstag im Patentblatt: 29. 3. 2001

- 30 Unionspriorität:  
84014 30. 06. 1993 US
- 73 Patentinhaber:  
Behring Diagnostics Inc., Westwood, Mass., US
- 74 Vertreter:  
Lemcke, Brommer & Partner, Patentanwälte, 76133  
Karlsruhe
- 84 Benannte Vertragsstaaten:  
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC,  
NL, PT, SE

- 72 Erfinder:  
Wong, T. Philip, Westwood, Massachusetts 02090,  
US; Hammond, Russell Allen, Boylston,  
Massachusetts 01505, US

54 Zusammensetzung zur Kalibrierung oder Kontrolle zur Verwendung in einem serologischen IgM-Test

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 694 25 709 T 2

23.11.00

LEMCKE · BROMMER & PARTNER  
PATENTANWÄLTE

BISMARCKSTR. 16 · D-76133 KARLSRUHE

0636886

21. November 2000

18 032 (A/gr)

5

## Beschreibung

### HINTERGRUND DER ERFINDUNG

10 Die Erfindung betrifft eine positive Kalibrierungs-/Kontrollzusammensetzung zur Verwendung in serologischen IgM-Tests und einen serologischen IgM-Test, der die positive Kalibrierungs-/Kontrollzusammensetzung benutzt.

15 Tests für Infektionskrankheiten erfordern sowohl negative als auch positive Kalibrierungs- und/oder Kontrollzusammensetzungen. Die negativen Kalibrierungen bestehen üblicherweise aus menschlichen Seren, die bekanntermaßen keine der interessierenden Antikörper beinhalten. Die positiven Kalibrierungszusammensetzungen werden üblicherweise dadurch hergestellt, dass die negativen Kalibrierungen mit bekannten Mengen der interessierenden, von menschlichen Patienten gewonnen Antikörpern angereicht werden. Die positiven Kontrollzusammensetzungen  
20 werden üblicherweise hergestellt, indem die negativen Kalibrierungen mit Mengen der Antikörper angereicht werden, die entweder denen gleichen, die in den Kalibrierungszusammensetzungen eingesetzt werden oder sich von diesen unterscheiden.

25 Es ist gut bekannt, dass die erste Immunantwort auf einen Infektionskrankheitswirkstoff in einem Individuum die Produktion von IgM-Antikörpern ist.

Die IgM-Immunantwort tritt jedoch nur für eine sehr kurze Zeitperiode auf, beispielsweise für einige Wochen oder einige Monate. Die IgG-Immunantwort folgt  
30 und setzt sich eine relativ lange Zeitperiode fort, beispielsweise eine Anzahl von Jahren.

Weil die erste Immunantwort die Produktion von IgM-Antikörpern ist und weil IgM-Antikörper kurzlebig sind, sind Tests bzgl. dieser Antikörper wichtig, weil derartige Tests eine frühe Indikation einer kürzlich erfolgten Infektion in einem Patienten ermöglichen. Aufgrund der kurzen Dauer der IgM-Antwort und der Tatsache, dass die Infektionskrankheit in einem Patienten nicht entdeckt werden kann, bis die IgM-Antwort geendet hat, ist es jedoch schwierig, einen ausreichenden Vorrat von IgM-Antikörpern von Individuen zu erhalten, um diesen in positiven Kalibrierungs-/Kontrollzusammensetzungen für Tests für die Infektionskrankheit einzusetzen. Weiter ist das Verfahren dafür arbeitsintensiv, sehr langwierig und sehr kostenintensiv. Eine vorgeschlagene Lösung war, in einem Test, wie in WO 89/10980 beschrieben, nicht-menschliche IgM-Antikörper als positive Kontrolle einzusetzen.

Es würde vorteilhaft sein, einen unbegrenzten Vorrat von Antikörpern gleichbleibender Qualität zu haben, der in den positiven Kalibrierungs-/Kontrollzusammensetzungen zur Verwendung in serologischen IgM-Tests eingesetzt werden kann. Dementsprechend ist es ein Ziel der vorliegenden Erfindung, eine positive Kalibrierungs-/Kontrollzusammensetzung zum Einsatz in serologischen IgM-Tests vorzusehen. WO 92/01472 beschreibt in einem Aspekt rekombinierte, chimere, multivalente Immunglobuline mit vielen antigenbindenden Bereichen. Es ist ebenso ein Ziel der Erfindung einen serologischen IgM-Test vorzusehen, der die positiven Kalibrierungs-/Kontrollzusammensetzungen gemäß der Erfindung benutzt.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

Diese und andere Ziele und Vorteile werden gemäß der Erfindung erreicht, indem eine positive Kalibrierungs-/Kontrollzusammensetzung zum Einsatz in einem Test vorgesehen wird, um Antikörper gegen Infektionskrankheiten zu detektieren, dazu gehört ein unspezifischer IgM-Immunglobulin, der kovalent an einen Nicht-IgM-Antikörper gebunden ist, der für den interessierenden Infektionskrankheitswirkstoff spezifisch ist. Wie im Detail beschrieben werden wird, werden die Bindungseigenschaften sowohl von dem unspezifischen IgM-Immunglobulin als auch den spezifischen Antikörper-Segmenten des zusammengesetzten Antikörpers in dem diagnostischen Test ausgenutzt. Die unspezifischen IgM-Immunglobuline können von Menschen oder von Tieren stammen, die Immunglobuline produzieren, die

gegenüber in Menschen produzierten hochgradig homolog sind und die im Wesentlichen dasselbe Bindungsverhalten zeigen wie unspezifische menschliche Immunoglobuline. Unspezifische IgM-Immunoglobuline sind in Individuen zu allen Zeiten vorhanden und können daher ohne Schwierigkeiten erlangt werden. Die Antikörper, die für den interessierenden Infektionskrankheitswirkstoff spezifisch sind können jeder Klasse angehören, das heißt, IgG, IgA, IgD oder IgE. Die spezifischen IgG-Antikörper werden bevorzugt, da sie reichlich vorhanden sind und in Individuen aufgrund der langen Dauer der IgG-Antwort auf den Infektionskrankheitswirkstoff eine lange Zeitperiode vorhanden sind.

Die Kalibrierungszusammensetzungen werden gewöhnlich dazu eingesetzt, einen Referenzsignal-Cut-off-Wert für den speziellen Analysenapparat zu bestimmen, der benutzt wird, um den Test auszuführen. Die Kontrollzusammensetzungen werden üblicherweise dazu eingesetzt zu überprüfen, ob Testelemente eines speziellen Fertigungsloses für deren beabsichtigten Zweck nützlich sind und abzusichern, dass der Analysenapparat richtig funktioniert. Die Kontrollzusammensetzungen können eine Menge des zusammengesetzten Antikörpers gemäß der Erfindung enthalten, die mit der Menge übereinstimmt, die in den Kalibrierungszusammensetzungen vorhanden sind oder von dieser verschieden ist.

In dem Testverfahren der Erfindung ist an einem festen Träger ein Einfangmaterial immobilisiert, das ausgewählt ist, speziell an den zusammengesetzten Antikörper zu binden, der in der positiven Kalibrierungs-/Kontrollzusammensetzung vorhanden ist. Im Allgemeinen werden die positive Kalibrierungs-/Kontrollzusammensetzung oder eine Fluidprobe, von der angenommen wird, dass sie die interessierenden IgM-Antikörper enthält und ein markiertes Konjugat mit dem festen Trägermaterial in Kontakt gebracht. Das Konjugat umfasst einen Markierungsanteil, der direkt oder indirekt detektierbar sein kann, und gebunden ist an ein Detektormaterial, welches ausgewählt ist, um an den zusammengesetzten Antikörper und an die Antikörper des interessierenden Infektionskrankheitswirkstoffs zu binden, der in einer Fluidprobe vorhanden sein kann. Nachfolgend, nach einer Zeitperiode, um zu ermöglichen, dass die notwendigen Bindungswechselwirkungen stattfinden, wird ungebundenes, markiertes Konjugat von gebundenem markiertem Konjugat getrennt und ein Signal als eine Funktion der Markierung des freien oder gebundenen Kon-

jugats generiert. Das Signal kann in dem Fall der positiven Kalibrierungs-/Kontrollzusammensetzung dazu eingesetzt werden, das Analyseinstrument zu kalibrieren oder im Falle einer Testprobe das Vorhandensein und/oder die Menge von interessierenden Antikörpern zu bestimmen.

5

Die positive Kalibrierungs-/Kontrollzusammensetzung und das Testverfahren der Erfindung kann für jeden serologischen IgM-Test eingesetzt werden, das heißt, für jeden Test bzgl. Antikörper gegen eine Infektionskrankheit. Zu typischen Infektionskrankheiten, für die IgM-Screening ausgeführt werden kann, gehören Röteln, der Cytomegalie-Virus, Toxoplasmose, die Lyme-Krankheit, Herpes I und II, der Epstein-Barr-Virus, HTLV, HIV, Syphilis, Hepatitis und der Varicella-Zoster-Virus (VZV).

10

Das Testverfahren der Erfindung ist sensitiv und speziell, und kann in einer bevorzugten Ausführungsform in einem Einzeltestmodulformat ausgeführt werden, was eine vollständige Testeinschließung ermöglicht. Gemäß der bevorzugten Ausführungsform, bei der der feste Träger einen relativ großen Oberflächenbereich aufweist, wie etwa in dem Fall eines faserartigen festen Trägers, wird weiter ein schnelles Einfangen vorgesehen durch eine relativ große Menge von Bindungsmaterial und einem weniger intensiven und weniger technikabhängigen Waschen aufgrund einer relativ geringen Konzentration des markierten Detektormaterials. Zusätzlich wird zum Einsatz in den Tests ein praktisch unbegrenzter Vorrat von zusammengesetzten Antikörpern für den Einsatz in den positiven Kalibrierungs- und Kontrollzusammensetzungen vorgesehen.

20

25

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

Für ein besseres Verständnis der Erfindung, genauso wie anderer Ziele und weiterer Merkmale davon, wird auf die folgende detaillierte Beschreibung von verschiedenen bevorzugten Ausführungsformen davon in Verbindung mit der begleitenden Zeichnung Bezug genommen, in der die Figur eine vereinfachte isometrische Ansicht eines Einzeltestmoduls darstellt, das für das Testverfahren eingesetzt werden kann.

30

## BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

Wie bereits bemerkt, können die unspezifischen IgM-Immunglobuline von Menschen oder von Tieren stammen, die phylogenetisch eng mit den Menschen verwandt sind. Derartige Tiere, beispielsweise Primaten und Schweine, produzieren Immunoglobuline, die hochgradig homolog sind zu diesen von Menschen produzierten und die im Wesentlichen dasselbe Bindungsverhalten zeigen. Die unspezifischen IgM-Immunglobuline, die in den zusammengesetzten Antikörpern inkorporiert sind und gemäß der Erfindung vorgesehen sind, können erzielt werden gemäß der Verfahren, die den Fachleuten des betreffenden Gebietes gut bekannt sind. Üblicherweise wird dies durch eine Technik gemacht, die als differentielle Präzipitation bekannt ist, in der unerwünschte Komponenten des Serums durch Hinzufügen von gesättigter Ammoniumsulfatlösung präzipitiert und austrangiert werden. Die überschüssige Ammoniumsulfatlösung wird dann behandelt, um die gewünschten, unspezifischen IgM-Immunglobuline zu präzipitieren, die dann für den Einsatz gelöst werden.

Die unspezifischen IgM-Immunglobuline, die in den zusammengesetzten Antikörpern eingesetzt werden, können das gesamte Immunglobulin sein oder nur der Fc-Fragmentbereich ( $\mu$  Kette), der an das Einfangmaterial auf dem festen Träger bindet. Weiter ist es nicht notwendig, die IgM-Immunglobuline hochgradig zu reinigen, die dazu eingesetzt werden, die Zusammensetzung zu bilden. Vorzugsweise wird die IgM-Lösung zu einer Konzentration von ca. 80 % oder mehr gereinigt.

Die spezifischen, Nicht-IgM-Antikörper, die in den zusammengesetzten Antikörpern der Erfindung inkorporiert sind, können monoklonal oder polyklonal sein und können von Menschen oder von Tieren erlangt werden. Die letzteren müssen Antikörper liefern, die spezifisch sind für den interessierenden Infektionskrankheitswirkstoff und die sich an das in dem Konjugat vorhandene Detektormaterial binden werden. Derartige spezifische Antikörper können von jedem Tier erlangt werden, das ausgesetzt wurde oder immunisiert wurde mit dem interessierenden ätiologischen Wirkstoff oder einem Fragment des ätiologischen Wirkstoffs. Bevorzugte Tiere für diesen Zweck sind Kaninchen, Ziegen und Mäuse. Für polyklonale, spezifische Antikörper werden vorzugsweise IgG-Antikörper eingesetzt, da diese reich-

lich vorhanden und ohne weiteres verfügbar sind. Polyklonale IgG-Antikörper können teilweise von Serumkomponenten gereinigt sein durch differentielle Präzipitation mit Amoniumsulfat oder Protein-G-Chromatographiesäulen. Spezifische polyklonale IgG-Antikörper können hochgradig gereinigt sein mit Affinitätschromatographiesäulen. Monoklonale Antikörper aller Klassen, das heißt, IgG, IgA, IgD, und IgE sind ohne weiteres verfügbar. Die gesamten spezifischen, Nicht-IgM-Antikörper können benutzt werden oder die Fab oder die F(ab')<sub>2</sub>-Segmente davon.

Die spezifischen Nicht-IgM-Antikörper können in Tieren gemäß der Verfahren gezüchtet werden, die den Fachleuten des Standes der Technik gut bekannt sind und daher ist eine ausführliche Diskussion dieser Techniken an dieser Stelle nicht erforderlich. Üblicherweise wird eine Immunisierungslösung oder -suspension dadurch hergestellt, dass eine Lösung oder -suspension hergestellt wird, die eine Substanz beinhaltet, die fähig ist, eine Antikörper-Produktion in einem Wirtstier anzuregen, beispielsweise mikrobielle Partikel wie etwa ganze oder zerbrochene Virus-, Bakterien- oder Parasitenpartikel, rekombinante Antigene, oder synthetische Peptide, deren Sequenz von dem Infektionskrankheitsätiologiewirkstoff in einem basischen Fluid (base fluid) identifiziert wurde. Die Lösung oder die Mischung wird mit einem geeigneten Puffer, wie etwa phospatgepuffertes Salz (PBS), pH 7,3, auf einen gewünschten pH gepuffert. Die erste Injektion wird mit einem Aliquot der Lösung oder der Mischung gemacht, zu der ein Adjuvant hinzugefügt wurde, der die Immunantwort des Tieres stimuliert, wie etwa Freund's Adjuvant Complete. In folgenden Auffrischungsimmunisierungen werden bevorzugt Aliquots der Immunisierungslösung oder -mischung eingesetzt, zu denen ein Adjuvant wie etwa Freund's Adjuvant Incomplete hinzugefügt wurde. Üblicherweise schließt das Immunisierungsprogramm zumindest drei Auffrischungsimmunisierungen in wöchentlichen Intervallen ein, beginnend eine Woche nach der Anfangsimmunisierung. Die Immunisierungen können auf jede geeignete Art verabreicht werden, einschließlich subkutan und intramuskulär.

Das Serum wird dem Wirtstier im Anschluß an das Immunisierungsprogramm entnommen und gemäß einem bekannten Testverfahren für die interessierende Infektionskrankheit getestet. Ein ausreichend hoher Antikörper-Titer wird durch ein positives Ergebnis des Tests angezeigt. Wenn das Antiserum den geforderten Spezi-

fikationen entspricht, wird das Antiserum üblicherweise dem Tier in Intervallen entnommen. Natürlich werden die Fachleute erkennen, dass der notwendige Antikörper-Titer entsprechend dem Testverfahren, für das die positive Kalibrierungs- oder Kontrolllösung gewünscht wird, variieren wird.

5.

Die erzielten Antiseren können oder können nicht vor dem Einsatz behandelt werden, um etwa jeden lebenden Infektionswirkstoff, der vorhanden sein kann, zu inaktivieren. Diese Antiseren werden üblicherweise vielfach, beispielsweise eintausendfach, in einem basischen Fluid verdünnt, wie etwa behandeltem menschlichem „off-clot“-Serum. Die Lösung kann Additive aufweisen, wie etwa als ein Konservierungsmittel einen antimikrobiellen Wirkstoff. Die Konzentration jeder speziellen positiven Kalibrierungs- oder Kontrollzusammensetzung wird abhängen von dem Cut-off-Signalwert, der für das Testverfahren bestimmt wird.

15

Die menschlichen unspezifischen IgM-Immunoglobuline und die spezifischen, Nicht-IgM-Antikörper können kovalent aneinander gebunden sein durch jede von vielen geeigneten Techniken und diese werden den Fachleuten des Gebietes offensichtlich sein, speziell angesichts der in dieser Schrift gegebenen Beispiele. Allgemein gesprochen sollte das kovalente Bindungsverfahren ausgeführt werden, um sicher zu stellen, dass die Antigen-Bindungsplätze der spezifischen Nicht-IgM-Antikörper und/oder diese der unspezifischen IgM-Immunoglobuline verfügbar sind zum Binden an das markierte Konjugat oder an das Einfangmaterial auf dem festen Träger. Folglich geschieht das kovalente Binden vorzugsweise nicht über das Fab-Segment der Nicht-IgM-Antikörper.

25

Die zusammengesetzten Antikörper können synthetisiert werden, indem die spezifischen, Nicht-IgM-Antikörper und die unspezifischen IgM-Immunoglobuline in verschiedenen molaren Verhältnissen zur Reaktion gebracht werden, beispielsweise in Verhältnissen von ca. 1:1 bis ca. 5:1 Nicht-IgM/IgM. Das bevorzugte molare Verhältnis in jedem spezifischen Beispiel ist abhängig von verschiedenen Faktoren, eingeschlossen den synthetischen Bedingungen und Reagenzien und dem Testaufbau, in dem beabsichtigt wird, die positive Kalibrierungs-/Kontrollzusammensetzung einzusetzen. Die Größe und das Nicht-IgM/IgM-Verhältnis in den resultierenden zusammengesetzten Antikörpern können heterogen sein aufgrund

30



molekularer Kreuzverbindungen und können abhängig sein von den Kreuzverbindungsbedingungen und den eingesetzten Reagenzien. Bevorzugterweise wird in dem Reaktionsverfahren ein 2:1 molares Verhältnis von Nicht-IgM/IgM eingesetzt.

5 Gemäß der Erfindung schließt ein Verfahren zum Synthetisieren der zusammengesetzten Antikörper anfängliches Reagieren der unspezifischen IgM-Immunglobuline mit einem Reagenz ein, das mit primären Aminen reagieren wird, um in Proteine Sulfhydryl-Gruppen einzubringen. Ein geeignetes Reagenz zu diesem Zweck ist 2-Iminoethanol (2-IT; Traut's Reagenz). Die spezifischen, Nicht-IgM-  
10 Antikörper werden mit einem heterobifunktionalen Reagenz in Reaktion gebracht, wie etwa N-γ-Maleinimidobuttersäureoxysuccinimid (GMBS) um diese Antikörper in Maleinimid-Gruppen einzubringen. Diese Maleinimid-Gruppen sind für eine Reaktion mit Proteinen verfügbar, die freie Sulfhydryl-Gruppen beinhalten, um kovalent gekoppelte Protein-Konjugate hervorzubringen.

15

Die Konjugat-Reaktion kann ausgeführt werden, indem die GMBS-aktivierten Nicht-IgM-Antikörper mit den 2-IT-aktivierten unspezifischen IgM-Immunglobulinen zur Reaktion gebracht werden bei einem 2:1 molaren Verhältnis (Nicht-IgM:IgM) für ca. 18 bis 24 h bei einer Temperatur von ca. 2° bis 8 °C. Die Reaktion wird ge-  
20 quentscht mit 2-Mercaptoethylamin und N-Ethylmaleinimid. Nach dem Quentschen werden die zusammengesetzten Antikörper in einer gepufferten Salzlösung, pH 7,6, dialysiert und die dialysierte, zusammengesetzte Antikörperlösung wird mit einem gleichen Volumen eines nichtreagierenden Serums verdünnt, das gegenüber dem interessierenden Infektionskrankheitswirkstoff nicht reaktiv ist. Die resultie-  
25 rende, zusammengesetzte Antikörperlösung wird als die reaktive Vorratslösung eingesetzt, für die ein Titer zugeteilt ist.

30

Der Titer der reaktiven Vorratslösung wird durch Anwenden bzw. Applizieren der analytischen Verfahren und Apparate bestimmt, die dazu eingesetzt werden, die unbekannten Fluidproben zu testen. Im Allgemeinen werden mehrere Verdünnungen der reaktiven Vorratslösung in nichtreaktivem menschlichen Serum hergestellt und jede Verdünnung zusammen mit den reaktiven und nichtreaktiven Referenzstandards getestet. Ein Verdünnungsfaktor wird der reaktiven Vorratslösung zuge-

wiesen, basierend auf den Daten, die gesammelt wurden, um die reaktive Kalibrierung oder Kontrolle herzustellen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird eine positive Kalibrierungs-/Kontrollzusammensetzung angegeben, die für eine Mehrzahl von serologischen IgM-Tests eingesetzt werden kann. Beispielsweise kann eine Kalibrierungs-/Kontrollzusammensetzung angegeben werden zum Einsatz mit Toxoplasmose-, Röteln-, Cythomegalovirus- und Herpes-Antikörper-Tests, indem in die Zusammensetzung zusammengesetzte Antikörper für jeden spezifischen interessierenden Antikörper inkorporiert werden. Vorteilhafterweise kann eine Kalibrierungs-/Kontrollzusammensetzung vorgesehen werden für den Einsatz mit einer Mehrzahl von Tests anstelle des Erfordernisses einer separaten Kalibrierungs-/Kontrollzusammensetzung für jeden Test.

Das Testverfahren der Erfindung schließt ebenfalls den Einsatz eines markierten Detektormaterials ein. Das Detektormaterial in dem markierten Konjugat kann jedes sein, das an die interessierenden Antikörper binden wird und an den zusammengesetzten Antikörper, der in der positiven Kalibrierungs-/Kontrollzusammensetzung vorhanden ist. Es ist verständlich, dass das Detektormaterial natürlich kein substantielles Binden an irgendwelche spezifischen IgM-Antikörper zeigen sollte, die in einem Testfluid vorhanden sein können und andere sind als die spezifischen IgM-Antikörper, für die der Test durchgeführt wird. Das Detektormaterial kann von jeder Art sein, eingeschlossen rekombinierte oder gereinigte gezüchtete Antigene, beispielsweise Extrakte von dem gesamten Infektionskrankheitswirkstoff, das ein Virus sein kann, eine Bakterie, ein Pilz, Protozoen, etc., Analoge dazu, synthetisch hergestellte Peptid-Sequenzen oder rekombinierte Proteine. Zu den typischen, geeigneten Bindungsmaterialien, die in das markierte Konjugat eingearbeitet werden können, gehören beispielsweise monoklonale und polyklonale anti-menschliche IgM-Antikörper, Lektine wie etwa Mannan-Bindungs-Proteine und Kichererbsen-Lektine („Chick Pea Lectin“) und ähnliche. Monoklonale Antikörper und synthetisch hergestellte Peptid-Sequenzen werden aufgrund ihrer Bindungsspezifität bevorzugt. Für HIV-Tests werden vorzugsweise markierte HIV I und II Peptid-Sequenzen eingesetzt aufgrund deren fehlender Kreuzreaktivität und deren Sicherheit bei der Handhabung.

Jeder dieser Markierungen, die für den Einsatz in immunometrischen Tests bekannt sind, können eingesetzt werden, dazu gehören beispielsweise fluoreszierende Anteile, Enzyme, chemolumineszente Anteile und radioaktive Materialien. Jede  
 5 Änderung in der Fluoreszenz, der Chemolumineszenz, der Radioaktivität oder anderer Strahlungsänderungen im sichtbaren oder nahen sichtbaren Bereich können ausgewertet werden. Folglich kann die Markierung direkt oder indirekt detektierbar sein. Wo die Markierung ein Enzym ist, kann es eins sein, dass mit einem Substrat interagiert, um eine Änderung in der Absorption zu verursachen, wo das Substrat  
 10 ein Chromogen ist, eine Änderung der Fluoreszenz, falls das Substrat ein Fluorophor ist, eine Änderung der Chemolumineszenz, wo das Substrat ein chemolumineszentes Material ist oder eine Änderung der Phosphoreszenz, wo das Substrat ein Phosphor ist. Vorzugsweise werden aufgrund der Verstärkung des Signals, das erreicht wird, Enzym-Markierungen eingesetzt.

Das Testverfahren gemäß der Erfindung kann jede Feste-Phase-Testtechnik verwenden, solange die feste Phase fähig ist, die zusammengesetzten Antikörper der positiven Kalibrierungs-/Kontrollzusammensetzung und die interessierenden Antikörper in einer Testprobe einzufangen. Das Einfangmaterial, dass an den festen  
 20 Träger immobilisiert ist, kann aus den Materialien ausgewählt werden, die im Zusammenhang mit dem Detektormaterial des markierten Konjugats beschrieben wurden. Jedes geeignete Material kann als der Einfangwirkstoff eingesetzt werden, dazu gehören monoklonale Antikörper, die gegen menschliche IgM-Antikörper gerichtet sind.

Der feste Träger kann von jeder geeigneten Art sein, dazu gehören Mikrotiterplatten, Kügelchen etwa aus polymerischem Material, magnetisches Material oder Glas, poröse Materialien wie etwa Membrane oder Fasermaterialien wie etwa Glas und ähnliche. Weiter kann jede geeignete Testtechnik angewandt werden, dazu  
 30 gehört die „Forward“-Testtechnik, in der das Probenfluid auf einen festen Träger angewandt wird, nach der Inkubationszeit gefolgt von der Anwendung einer markierten Konjugatlösung und die „Revers“-Testtechnik, in der das Probenfluid zuerst mit einer markierten Konjugatlösung kombiniert wird, um einen Komplex zu bilden und der resultierende Komplex wird auf den festen Träger appliziert.

Wie zuvor beschrieben, kann das Verfahren der Erfindung die Bindungscharakteristiken sowohl des unspezifischen IgM-Immunglobulins als auch die spezifischen, Nicht-IgM-Antikörper-Segmente der zusammengesetzten Antikörper in der positiven Kalibrierungs-/Kontrollzusammensetzung verwerten. In einer Ausführungsform ist das Einfangmaterial an dem festen Träger immobilisiert, beispielsweise ist ein monoklonaler Antikörper ausgewählt, um an das unspezifische IgM-Immunglobulin-Segment des zusammengesetzten Antikörpers zu binden (und ebenso an den interessierenden Infektionskrankheitsantikörper). In dieser Ausführungsform ist das in das markierte Konjugat inkorporierte Detektormaterial (beispielsweise ein Extrakt oder Fragment eines ätiologischen Wirkstoffs) ausgewählt, um an das spezifische, Nicht-IgM-Antikörpersegment zu binden. Diese Ausführungsform ist speziell bevorzugt, wenn das feste Trägermaterial einen relativ großen Oberflächenbereich aufweist, wie der in einem faserigen Filtermaterial vorhandene.

In einer weiteren Ausführungsform kann das auf dem festen Träger immobilisierte Einfangmaterial ausgewählt werden, um an das spezifische Nicht-IgM-Antikörper-Segment des zusammengesetzten Antikörpers und an die interessierenden Infektionskrankheitsantikörper zu binden. In dieser Ausführungsform ist das Detektormaterial in dem markierten Konjugat, beispielsweise ein antimenschlicher IgM-Antikörper ausgewählt, um an das unspezifische IgM-Immunglobulin-Segment des zusammengesetzten Antikörpers zu binden. Diese Ausführungsform ist speziell bevorzugt für den Einsatz mit Mikrotiter-Plattentests.

Die Erfindung wird nun im Detail weiterbeschrieben hinsichtlich einer speziellen bevorzugten Testtechnik gemäß der Erfindung, wobei als fester Träger ein poröses Material eingesetzt wird. In dieser bevorzugten Ausführungsform hat das poröse Element vorzugsweise einen relativ großen Oberflächenbereich, um das Einfangen der IgM-Antikörper zu ermöglichen, die in einem Probenfluid vorhanden sind. Das poröse Element kann eine poröse Membran sein, ein faseriges Netzkissen oder ähnliches und kann aus jedem geeigneten Material sein wie etwa Glas, polymerischen Materialien, Papier, etc.

Wie zuvor angemerkt, ist an dem porösen Element ein Bindungs- oder Einfangsmaterial immobilisiert, das fähig ist, an die IgM-Immunglobuline zu binden und ebenso an die zusammengesetzten Antikörper in den positiven Kalibrierungs-/Kontrollzusammensetzungen. Jede der obengenannten geeigneten Bindungsmaterialien können eingesetzt werden. Die Menge von Bindungsmaterial für jeden speziellen Test variiert mit dem Test und kann durch konventionelle experimentelle „Scoping“-Methoden optimiert werden. Vorzugsweise wird die Menge von Bindungsmaterial berechnet, die notwendig ist alle oder im Wesentlichen alle der IgM-Antikörper in der Patientenprobe zu binden und einen Überschuss dieser Menge auf das poröse Element anzuwenden.

Das Bindungsmaterial kann auf das poröse Element angewendet werden und daran durch jede der verschiedenen bekannten Methoden immobilisiert werden, dazu gehören physikalisches Einschließen und chemisches Binden. Beispielsweise kann eine Lösung des Bindungsmaterials auf das poröse Element angewandt werden und das Element nachfolgend getrocknet werden, um ein poröses Element zu liefern, bei dem das Bindungsmaterial überall verteilt ist und in diesem durch die Struktur des Elements gehalten ist. In einer weiteren Ausführungsform, speziell wenn das poröse Element ein faserartiges Netzmaterial aufweist, kann das Bindungsmaterial chemisch gebunden sein oder an polymerischen Partikeln adsorbiert sein und das faserartige Netzkissen imprägniert sein mit dem aus Partikeln bestehenden Stoff. Auf diese Art und Weise ist das Bindungsmaterial an das poröse Element immobilisiert und verbleibt dort während des gesamten Testverfahrens. Eine bevorzugte Methode ist es, eine Lösung des Bindungsmaterials auf das poröse Element anzuwenden und nachfolgend das Element zu erwärmen, um das Bindungsmaterial daran zu fixieren.

Dieses Verfahren der Erfindung kann in verschiedenen Ausführungsformen praktiziert werden. In einer Ausführungsform kann die Testprobe zu Beginn auf das poröse Element angewandt werden, worauf ein Inkubationsschritt folgt, der es erlaubt, die spezifischen IgM-Antikörper in dem Probenfluid interagieren zu lassen und an das Bindungsmaterial auf dem porösen Element binden zu lassen. Eine Lösung des Konjugats wird dann auf das poröse Element angewandt, worauf ein Inkubationsschritt folgt. In einer weiteren Ausführungsform wird ein Volumen der

Fluidprobe, beispielsweise ca. 30 µl, zu einer Lösung des markierten Konjugats in einem Puffer hinzugefügt und das Gemisch inkubiert, um zu ermöglichen, dass die Interaktionen zwischen dem markierten Konjugat und dem interessierenden Antikörper stattfinden. Ein Aliquot dieses Reaktionsgemisches wird dann auf das poröse Element abgeschieden, gefolgt von einem weiteren Inkubationsschritt, um zu ermöglichen, dass die Interaktionen zwischen dem Bindungsmaterial und den Antikörpern in der Fluidprobe auftreten.

10 Nachdem die interagierenden Elemente in der Reaktionszone zusammengebracht wurden und das Interagieren unter den geeigneten Bedingungen für die notwendige Zeitperiode ermöglicht wurde, wird jedes freie markierte Konjugat von der Reaktionszone entfernt, etwa durch einen Auswaschschritt, wobei eine Auswaschlösung auf das poröse Element angewandt wird.

15 Nachfolgend wird jedes gebundene markierte Konjugat durch geeignete Mittel detektiert. Wie zuvor beschrieben, kann die Markierung direkt oder indirekt detektierbar sein. In dem Fall einer Enzymmarkierung kann die Substratlösung, die auf das poröse Element angewandt wird, um die Markierung detektierbar zu machen, ebenso eingesetzt werden wie die Waschlösung, um von dem porösen Element jedes freie, markierte Konjugat zu entfernen.

25 In einer speziellen, bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird das Verfahren mit einem Einzeltest-Kapillartestmodul praktiziert, das geeignet ist zum Einsatz in automatisierten analytischen Testinstrumenten. Bezugnehmend nun auf die Figur ist dort ein in sich abgeschlossenes Testmodul oder -element 10 abgebildet, das alle Testreagenzien trägt außer dem Probenfluid oder der für einen speziellen Test notwendigen Kalibrierungs-/Kontrollzusammensetzung. Zu diesem bevorzugten Testelement gehören eine Vielzahl von Kammern in einem Gehäuse 22, wobei eine erste Kammer als ein vorderes Reservoir 24 zur Speicherung der markierten Konjugatlösung dient. Die Lösung wird mit einer frangiblen oder punktierbaren Folienschicht bedeckt (nicht gezeigt). Eine zweite der Kammern dient als ein hinteres Reservoir 26 für die Speicherung einer Substratlösung, die ebenfalls mit einer ähnlichen Folienschicht bedeckt ist (nicht gezeigt). Eine optionale dritte Kammer dient als Mischungsbecken 28 zum Mischen der Reagenzien und eine vierte Kam-

mer bildet den Teil einer Ausgabevorrichtung 30, das dazu eingesetzt wird, die Substratlösung an das eine Ende des porösen Elements 32 auszugeben. Dort ist ebenso innerhalb des Gehäuses 22 eine Kammer 34 gezeigt, wobei dort ein absorbierendes Material angeordnet ist zum Absorbieren von Fluid, das von dem porösen Element entfernt wurde, etwa durch ein Waschfluid, wenn es durch das poröse Element 32 fortschreitet.

In dieser bevorzugten Ausführungsform ist das poröse Element 32 ein dünnes poröses Element, das überall ein interkommunizierendes Netzwerk von Öffnungen aufweist, so dass ein auf das Element abgelagertes Fluid aufgrund von Kapillarkwirkung durch das ganze Element fortschreitet. Das dünne poröse Element 32 kann jedes geeignete Element sein wie etwa eine poröse Membran, ein faserartiges Netzkissen oder ähnliches und kann aus jedem geeigneten Material sein, wie etwa Glas, polymerischen Materialien, Papier, etc. In einer bevorzugten speziellen Ausführungsform weist das poröse Element 32 ein ungewebtes Glasfasernetz mit sehr dünnen Fasern auf, etwa von der Größenordnung von ca. 1  $\mu\text{m}$ .

Das poröse Element 32 ist innerhalb einer Führung montiert (nicht gezeigt), die innerhalb des Gehäuses 22 eingeformt ist und Ober- und Unterseiten aufweist, die in einer Entfernung beabstandet sind, die ausreicht, das Element 32 zu unterstützen. Beispielsweise kann der Abstand zwischen den Ober- und Unterseiten der Führung in einem Bereich von ca. 0,30 mm bis ca. 0,60 mm sein; der bevorzugte Abstand ist ca. 0,40 mm.

Das poröse Element 32 erstreckt sich von der Ausgabevorrichtung 30 zu der Kammer 34, die das absorbierende Material beinhaltet. Die Ausgabevorrichtung 30 wird als ein Behälter zum Halten eines Fluids konfiguriert; zu der Ausgabevorrichtung 30 gehört eine Öffnung an dem Boden des Behälters und Mittel, um die Verbindung des Fluids von dem Boden des Behälters in das poröse Element 32 zu ermöglichen. Flüssiges absorbierendes Material 36, das aus jedem geeigneten Material sein kann, ist innerhalb der Kammer 34 angeordnet und bildet einen Teil der Kammer 34 zum Aufnehmen des Fluids, das von dem porösen Element 32 und dem Führungsbereich oder der Reaktionszone ausgestoßen wird. Absorbierendes Material 36 ist zusammenhängend an dem porösen Element 32 angeordnet und in

einer bevorzugten Ausführungsform (wie dargestellt) passend als eine Extension des porösen Materials auf sich selbst vor- und zurückgefaltet gebildet.

Zu dem Gehäuse 22 gehört vorzugsweise eine Kammer 38, die direkt über der horizontalen Oberseite des porösen Elements 32 angeordnet ist und die eine Öffnung an der Bodenperipherie davon aufweist, um Fluid zu ermöglichen, an das poröse Element 32 abgegeben zu werden. Zu dem Gehäuse 22 kann ein transparenter Fensterbereich (nicht gezeigt) gehören, der direkt unterhalb der horizontalen Unterseite des porösen Elements 32 angeordnet ist, um für die Beleuchtung Zutritt zu verschaffen, die eingesetzt wird, um jede detektierbare Änderung, die in dem porösen Element als ein Resultat des Testverfahrens bewirkt wird, zu messen oder es kann dazu vorzugsweise eine Öffnung in dem Gehäuse gehören, um zu ermöglichen, dass auf das poröse Element eine Auslesebeleuchtung gerichtet wird, ohne durch das Material, aus dem das Gehäuse besteht, hindurchtreten zu müssen.

Das Probenfluid, das gemäß dem Testverfahren der Erfindung getestet wird, kann jedes sein, eingeschlossen gesamtes Blut, Plasma oder Serum. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird eine kleine Menge, beispielsweise ca. 20 µl von einer Patientenprobe entnommenes Serum zu dem porösen Element 32 durch eine Kammer 38 über eine Pipette hinzugefügt und dem Testelement wird ermöglicht, für die notwendige Zeitperiode zu inkubieren. Es wird verständlich sein, dass die Menge der erforderlichen Patientenprobe von Test zu Test variieren kann. Nachfolgend wird enzymmarkierte Konjugatlösung in Kammer 24 (beispielsweise 20 µl) in eine saubere Pipettenspitze aspiriert, die die Folienschicht über der Kammer 24 perforiert hat und dann auf der Oberfläche des porösen Elements 32 durch die Kammer 38 abgelagert. Dem Testmodul wird wieder ermöglicht, für eine geeignete Zeitperiode zu inkubieren, um zu ermöglichen, dass die Wechselwirkungen stattfinden. Nachfolgend wird die Folienschicht, die die Kammer 26 bedeckt, um eine Versiegelung über der Substratlösung in der Kammer zu bilden, durch eine Pipette perforiert, die eine saubere Spitze trägt, und ein gewünschtes Volumen der Substratlösung, typischerweise ca. 90 µl, wird in die Pipettenspitze aspiriert. Die Substratlösung wird dann in die Kammer 30 eingelagert, von wo es ermöglicht wird, mit einem Ende des porösen Elements 32 in Kontakt zu kommen und dann durch Kapillarwirkung durch das ganze Element gezogen zu werden. Dem Testmodul



wird dann ermöglicht zu inkubieren, um es zu erlauben, dass die Reaktion zwischen dem Substratmaterial und jeder gebundenen Enzymmarkierung stattfindet. Es ist offensichtlich, dass die Substratlösung in dieser Ausführungsform ebenso als ein Waschfluid eingesetzt wird. Wenn die Substratlösung durch das poröse Element 32 fortschreitet, drängt es jedes freie enzymmarkierte Konjugat zusammen mit dem Fluid aus dem porösen Element heraus und in die Absorberkammer 34 hinein, wo sie durch das absorbierende Material 36 aufgenommen werden. Das Signal, das von den durch die Reaktion zwischen dem Substratmaterial und dem Enzym befreiten Spezies geliefert wird, beispielsweise eine fluoreszierende Spezies, wird dann durch geeignete Auslesemittel, beispielsweise ein Fluorometer ausgelesen. Sowohl qualitative als auch quantitative Resultate können mit diesem Verfahren erzielt werden. Das Verfahren der Erfindung, wie ausgeführt mit dem dargestellten, bevorzugten Testmodul, kann mit einem automatisierten Testinstrument durchgeführt werden, was folglich einen vollständig in sich geschlossenen Test liefert, der ein Minimum von Bedienerbeteiligung erfordert, und der die Bedienerunbeständigkeit eliminiert.

Das Testverfahren involviert wie vorab ausgeführt, den Einsatz von negativen und positiven Kalibrierungen. Im Allgemeinen wird für den speziellen Apparat ein Referenzsignal-Cut-off-Wert bestimmt, der eingesetzt wird, um den Test auszuführen. Der Referenz-Cut-off-Wert kann gemäß verschiedener, bekannter Methoden bestimmt werden. Beispielsweise kann ein Cut-off-Wert durch das Ausarbeiten einer Dosis-Antwort-Kurve erzielt werden. Wie auch immer er bestimmt wird, wird der Referenz-Cut-off-Wert dann validiert durch das Testen einer großen Anzahl von bekannten, positiven und negativen klinischen Proben.

Die Erfindung wird nun weiter im Detail beschrieben anhand spezifischer bevorzugter Ausführungsformen anhand von Beispielen; es wird verstanden, dass diese nur dazu gedacht sind zu veranschaulichen und die Erfindung ist nicht auf die dort aufgeführten Materialien, Bedingungen, Verfahren, etc. begrenzt.

BEISPIEL IReinigung des IgM von menschlichem Serum

- 5 Zu 500 ml von Anti-Toxoplasmose-Negativ-Serum wurde eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung (pH 7,0) zu 30 % hinzugefügt, volumenmäßig, wobei 20 Minuten gerührt wurde. Nach dem Rühren von weiteren 30 Minuten wurde die Lösung 20 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert. Die überschüssige Ammoniumsulfatlösung wurde in einen sauberen Behälter dekantiert und mit einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung auf 50 % gebracht. Die Lösung wurde weitere 30 Minuten gerührt und dann 20 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert.

- Die überschüssige Lösung wurde aussortiert und das IgM-Pellet wurde in 50 ml einer 20 mM Natriumphosphatlösung (pH 7,0) suspendiert. Die Leitfähigkeit der  
15 IgM-Lösung wurde auf annähernd die gleiche Leitfähigkeit angepasst wie eine 0,16 M Ammoniumsulfatlösung durch Verdünnen der IgM-Lösung mit destilliertem Wasser. Die IgM-Immunglobuline wurden aus der Lösung präzipitiert durch Hinzufügen einer 24 %-Lösung von Polyethylenglykol (durchschnittliches Molekulargewicht 8000) auf eine Endkonzentration von 6 %. Das Rühren wurde dann 30 Minuten  
20 fortgesetzt, gefolgt von einem 30-minütigen Zentrifugieren bei 3000 x g. Die überschüssige Lösung wurde aussortiert und das IgM-Pellet wurde in 250 ml von 50 mM Tris-Puffer (pH 7,6), 150 mM NaCl aufgelöst, gefolgt von einer extensiven Dialyse gegen denselben Puffer. Nach dem Dialyseschritt wurde die IgM-Lösung  
25 durch einen 0,8 µm Filter gefiltert, dann durch einen 0,45 µm Filter und schließlich durch einen 0,2 µm Filter. Ca. 0,1 % eines Präservierungsmittels, Kathon, wurden hinzugefügt und die Lösung bei einer Temperatur von ca. 2° bis 8° C gelagert.

BEISPIEL II

30

Reinigung von Kaninchen IgG

Ca. 5 bis 15 ml eines Kaninchen-Anti-Toxoplasmose-Serums wurden auf eine rekombinierte Protein-G-Sepharosesäule angewandt, die in phosphatgepuffertem Salz (PBS) – 20 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, pH 7,2 abgeglichen wurde.

Nachdem die Probe in die Säule eingebracht wurde, wurde sie mit 50 ml PBS gewaschen. Das IgG wurde aus der Säule mit 0,1 M Glycine, pH 2,5, eluiert. Zehn 5 ml Fraktionen wurden in Röhrchen gesammelt, die 0,5 mL von 2 M Tris Puffer, pH 8,0 beinhalten. Die Absorption jeder Fraktion wurde bei 280 nm bestimmt und die Fraktionen mit Absorption oberhalb von 0,7 wurden zusammengefasst und dialysiert gegen 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6. Nach der Dialyse wurde das Kaninchen-IgG durch einen 0,2 µm Filter gefiltert und ein Präservierungsmittel, 0,1 % Kathon, wurde hinzugefügt. Das gereinigte Kaninchen-IgG wurde bei einer Temperatur von ca. 2° bis 8° C gelagert.

### BEISPIEL III

#### Konjugation von Kaninchen-IgG zu menschlichem IgM

- Annähernd 60 mg von menschlichem IgM und 20 mg von Kaninchen-Anti-Toxoplasma-IgG wurden jeweils auf ca. 8 bis 10 mg/ml konzentriert, indem ein Amicon Centriprep 30 eingesetzt wurde. Beide Antikörperlösungen wurden gegen PE-Puffer dialysiert (0,1 M Natriumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,0).
- Die Kaninchen-IgG-Antikörper wurden mit GMBS aktiviert durch Hinzufügen einer 20 mg/ml Lösung von GMBS in Dimethylformamid zu der IgG-Lösung bei einem 20:1 molaren Verhältnis (GMBS:IgG) und die Lösung wurde 60 Minuten inkubiert bei 30° C. Das aktivierte IgG wurde von Rückständen von GMBS gereinigt, indem die Reaktionsmischung durch eine PD 10 Säule (Pharmacia) in PE-Pufferlösung geleitet wurde. Fraktionen von 1 ml wurden gesammelt und diejenigen, die bei 280 nm eine Absorption größer als 0,7 im ersten Peak aufwiesen, wurden zusammengefasst.

- Das menschliche IgM wurde aktiviert mit 2-Iminoethanol durch Hinzufügen von 100 mM von 2-IT in destilliertem Wasser zu der IgM-Lösung zu einer Endkonzentration von 5 mM 2-IT durch Hinzufügen eines 1/20 Volumens von 100 mM 2-IT. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur 20 Minuten inkubiert, gefolgt von einem Hinzufügen von 100 µl von 1 M Glycine zu der Reaktionsmischung und Inkubation von 5 Minuten. Das aktivierte IgM wurde gereinigt von Rückständen von 2-

IT durch Durchleiten der Reaktionsmischung durch eine Sephadex G-25 Säule in PE-Pufferlösung und 1 ml Fraktionen wurden gesammelt. Die Fraktionen mit einer Absorption (bei 280 nm) von mehr als 0,5 in dem ersten Absorptionspeak wurden zusammengefasst.

5

Die GMBS-aktivierte Kaninchen-IgG-Antikörperlösung wurde zu der 2-IT-aktivierten menschlichen IgM-Lösung bei einem molaren Verhältnis von 2:1 (IgG:IgM) hinzugefügt und die Reaktionsmischung wurde ca. 18 bis 24 h bei einer Temperatur von ca. 2° bis 8° C inkubiert. Die Konjugationsreaktionsmischung wurde gequentscht durch Hinzufügen von 1/100 Volumens von 100 mM 2-Mercaptoethylamin in PE-Pufferlösung, gefolgt durch eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und dem Hinzufügen von 1/100 Volumens von einer 25 mg/ml Lösung von N-Ethylmaleinimid in Dimethylformamid. Die Reaktionsmischung wurde dann 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und das Konjugat in 50 mM Tris dialysiert, 150 mM NaCl, pH 7,6.

15

Zu der Konjugatlösung wurde ein gleiches Volumen eines negativen Anti-Toxoplasmoseserums hinzugefügt. Die Lösung wurde dann durch einen 0,2 µm Filter gefiltert und Kathon wurde zu einer Konzentration von ca. 1 % hinzugefügt.

20

Die zusammengesetzten Antikörper wurden als positive Kalibrierungen und Kontrollen für die Tests eingesetzt, die in den folgenden Beispielen ausgeführt wird.

#### BEISPIEL IV

25

Tests für zusammengesetzte, unspezifische IgM/spezifische Nicht-IgM-Antikörper in der reaktiven Kalibrierung oder spezifische IgM in Patientenproben von Serum oder Plasma zu Toxoplasma Gondii wurden ausgeführt gemäß dem Verfahren der Erfindung in Übereinstimmung mit dem folgenden Verfahren. Eine Lösung von monoklonalem Antikörper mit menschlichem IgM bei einer Konzentration von 1,25 mg/ml in 50 mM Tris Puffer, pH 7,5, 0,1 % Triton X-100 und 0,1 % Kathon, wurde hergestellt und 25 µl wurden auf ein annähernd 1 cm<sup>2</sup>, poröses, glasfaserartiges Netzkissen angewandt, Ahlstrom # 161, in Kammer 38 in einem Testmodul der in der Figur dargestellten Art. Die Menge von Bindungsmaterial, die auf das Netz an-

30

gewandt wurde, wurde so berechnet, dass sie theoretisch mehr war als das, was zum Binden aller IgM in einer üblichen Patientenprobe erforderlich war. Das Testmodul wurde oberhalb Raumtemperatur getrocknet, um das Bindungsmaterial an dem faserartigen Kissen zu fixieren.

5

Insgesamt wurde 20 µl von Kalibrierung oder Probe zu dem faserartigen Kissen hinzugefügt in dem Bereich, der mit Bindungsmaterial überzogen war, gefolgt von einer 6-minütigen Inkubation bei 37° C, um zu ermöglichen, dass das Bindungsmaterial IgM einfängt. Zu dem Bereich des faserartigen Kissens, das mit dem Bindungsmaterial beschichtet war, wurden 20 µl eines Toxoplasmose-Antigenextrakts hinzugefügt, das vorab kovalent zu alkalischer Phosphatase konjugiert wurde und in einem Puffer auf die gewünschte Konzentration verdünnt wurde, bestehend aus 50 mM TRIS, pH 7,6, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 8 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 U/ml Heparin, 0,1 % Triton-X-100, 1 % Gelatine, 1 % BSA und 0,1 % Kathon. Die Reaktanden wurden 6 Minuten bei 37° C inkubiert, um das Einfangen der enzymmarkierten Antigene durch spezifische Antikörper zu ermöglichen. Nachfolgend wurden zu der Waschoffnung, Kammer 30, des Moduls 90 µl einer Substrat-/Waschlösung hinzugefügt, bestehend aus 1 mM Methyl Umbelliferyl Phosphat, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 M NaCl, 10 mM Levamisol.HCl, 5mM Phenylalanylglycylglycine, 0,5 mM TRIS, pH 9,5, und 0,1 % Triton X-100. Der Substrat-/Waschlösung wurde ermöglicht, das faserartige Kissen zu erreichen und durch dieses durch Kapillarkwirkung hindurchzufließen, wodurch der Probenbereich insgesamt 6 Minuten bei 37° C gewaschen wurde.

25

Ein Auslesen der Reaktionszone wurde nach einer 6-minütigen Zeitperiode durchgeführt und ein zweites Auslesen wurde 300 Sekunden später durchgeführt, wobei ein Vorderseitenfluorometer eingesetzt wurde, indem 360 nm Strahlung durch eine Öffnung in dem Testmodul, benachbart zu der Reaktionszone, gerichtet wurde und indem die reflektierte 450 nm Strahlung gesammelt wurde. Der Anstieg der Fluoreszenz, einer Funktion des gebundenen enzymmarkierten Konjugats, wurde berechnet. Das erhaltene Resultat wurde mit den Resultaten verglichen, die mit einer definierten negativen Kalibrierung erreicht wurden und den in Beispiel III beschriebenen positiven Kalibrierungen und wurde dadurch bestimmt positiv oder negativ zu sein auf der Basis eines determinierten Cut-off-Werts.

30

Insgesamt 382 Patientenproben wurden hinsichtlich Toxoplasmose-M mit einem OPUS® Immunotestanalysierer getestet (PB Diagnostic-Systems, Inc.). Eine positive Kalibrierungszusammensetzung, zu der menschliche Anti-Toxo-M Antikörper gehören, wurde zusammen mit einer negativen Kalibrierung eingesetzt, um den cut-off-Wert zu ermitteln. Für Vergleichszwecke wurden die Patientenproben ebenso mit einem indirekten Fluoreszent-Antikörpertestset (IFA) der Gull Laboratorien getestet. Die Resultate werden in Tabelle I gezeigt.

**TABELLE I**

	GULL TOXO-M IFA	
	NEGATIV	POSITIV
OPUS TOXO-M		
NEGATIV	277	3
UNBESTIMMT	12	6
POSITIV	16	68

Es ist gezeigt, dass von den 71 Proben, die durch das Gull Testset als positiv detektiert wurden (die 6 Proben, die als unbestimmt eingestuft wurden, wurden gemäß der Standard Industriepaxis nicht eingeschlossen), das OPUS-Testmodul 68 als positiv detektierte. Folglich war die OPUS-Testmodulsensitivität (verglichen mit der Gull IFA) 95,8 % (68/71).

Es ist weiterhin erkennbar, dass von 293 durch das Gull Testset gefundenen negativen Proben (die 12 unbestimmten Resultate wurden aussortiert), das OPUS-Testmodul 277 als negativ detektierte. Folglich war die OPUS-Testmodulspezifität (verglichen mit der Gull IFA) 94,5 % (277/293).

Sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität des OPUS-Testmoduls liegen innerhalb der akzeptierten Industriestandards.

**BEISPIEL V**

Ein Cut-off-Wert wurde mit einem OPUS-Immunotestanalysierer bestimmt, einsetzend eine negative Kalibrierungszusammensetzung und eine positive Toxo-M Kalibrierungszusammensetzung gemäß der Erfindung. Die Signalwerte, die für die 382 mit dem OPUS-Analysierer und mit dem Gull IFA von Beispiel IV getesteten Patientenproben erzielt wurden, werden mit den Cut-off-Werten verglichen, die mit der positiven Kalibrierung erzielt wurden, die die zusammengesetzten Antikörper gemäß der Erfindung aufweisen. Die Resultate werden in Tabelle II gezeigt.

**TABELLE II**

		<b>GULL TOXO-M IFA</b>	
		<b>NEGATIV</b>	<b>POSITIV</b>
<b>OPUS TOXO-M</b>	<b>NEGATIV</b>	269	2
	<b>UNBESTIMMT</b>	16	3
	<b>POSITIV</b>	20	72

Es ist erkennbar, dass von 74 Proben, die durch das Gull Testset als positiv bestimmt wurden, das OPUS-Testmodul 72 als positiv detektiert hat. Folglich war die Modulsensitivität (mit der positiven Kalibrierungszusammensetzung der Erfindung) 97,2 % (72/74) verglichen mit der Gull IFA.

Es ist ebenso zu erkennen, dass von 289 Proben, die durch das Gull IFA als negativ eingestuft wurden, das OPUS-Testmodul 269 als negativ detektiert hat, was eine Spezifität von 93,1 % (269/289) verglichen mit dem Gull IFA bedeutet.

Sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität des OPUS-Testmoduls in Kombination mit der positiven Kalibrierungszusammensetzung der Erfindung liegen innerhalb akzeptierter Industriestandards.

Patentansprüche

1. Positive Kalibrierungs- oder Kontrollzusammensetzung zur Verwendung in einem serologischen IgM-Test umfassend eine Lösung eines zusammengesetzten Antikörpers eines unspezifischen IgM-Immunglobulinanteils, der kovalent an einen spezifischen, nicht-IgM-Antikörperanteil gebunden ist, wobei besagter spezifischer, nicht-IgM-Antikörperanteil gegen einen spezifischen Infektionskrankheitserregerswirkstoff gerichtet ist.
2. Positive Kalibrierungs- oder Kontrollzusammensetzung nach Anspruch 1, wobei der besagte unspezifische IgM-Immunglobulinanteil aus einem menschlichen unspezifischen IgM-Immunglobulin besteht.
3. Positive Kalibrierungs- oder Kontrollzusammensetzung nach Anspruch 1, wobei der besagte spezifische, nicht-IgM-Antikörperanteil aus einem nicht-menschlichen IgG-Antikörper besteht.
4. Positive Kalibrierungs- oder Kontrollzusammensetzung nach Anspruch 1, wobei der besagte zusammengesetzte Antikörper einen menschlichen unspezifischen IgM-Immunglobulinanteil umfaßt, der kovalent an einen spezifischen IgG-Antikörperanteil gebunden ist.
5. Positive Kalibrierungs- oder Kontrollzusammensetzung nach Anspruch 1, wobei der besagte spezifische, nicht-IgM-Antikörperanteil aus einem monoklonalen Antikörper besteht.
6. Positive Kalibrierungs- oder Kontrollzusammensetzung nach Anspruch 1, wobei der besagte unspezifische IgM-Immunglobulinanteil aus dem IgM-Gesamtimmunglobulin oder dessen Fc-Fragmentbereich besteht.
7. Positive Kalibrierungs- oder Kontrollzusammensetzung nach Anspruch 1, wobei der besagte spezifische, nicht-IgM-Antikörperanteil aus dem gesamten Antikörper oder aus dessen F(ab')<sub>2</sub>-Segment besteht.



8. Positive Kalibrierungs- oder Kontrollzusammensetzung nach Anspruch 1, wobei der besagte spezifische, nicht-IgM-Antikörperanteil aus einem Antikörper besteht, der aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus HIV-Antikörpern, HTLV-Antikörpern, Cytomegalie-Virus-Antikörpern, Toxoplasmose-Antikörpern, Röteln-Antikörpern, Herpes-Antikörpern, Lyme-Krankheits-Antikörpern und Hepatitis-Antikörpern besteht.

9. Positive Kalibrierungs- oder Kontrollzusammensetzung nach Anspruch 1, wobei der besagte zusammengesetzte Antikörper durch Reaktion eines unspezifischen IgM-Immunglobulins mit einem spezifischen nicht-IgM-Antikörper bei einem Molverhältnis von ungefähr 1:1 bis ungefähr 1:5 hergestellt ist.

10. Positive Kalibrierungs- oder Kontrollzusammensetzung nach Anspruch 9, wobei der zusammengesetzte Antikörper hergestellt ist durch Reaktion eines unspezifischen IgM-Immunglobulins mit einem spezifischen nicht-IgM-Antikörper bei einem Molgewicht von ungefähr 1:2.

11. Positive Kalibrierungs- oder Kontrollzusammensetzung nach Anspruch 1 und außerdem mit zumindest einem zusätzlichen zusammengesetzten Antikörper eines unspezifischen IgM-Immunglobulins, kovalent an einen spezifischen nicht-IgM-Antikörperanteil gebunden, der gegen einen spezifischen Infektionskrankheitswirkstoff gerichtet ist, wobei jeder spezifische nicht-IgM-Antikörperanteil jedes zusammengesetzten Antikörpers gegen einen unterschiedlichen spezifischen Infektionskrankheitswirkstoff gerichtet ist.

12. Verfahren zum Durchführen eines Tests mit einer positiven Kalibrierungs- oder Kontrollzusammensetzung hinsichtlich der Anwesenheit von IgM-Antikörpern für eine Infektionskrankheit, umfassend die Verfahrensschritte:

a) Applizieren (i) einer positiven Kalibrierungs- oder Kontrollzusammensetzung, die zusammengesetzte Antikörper umfaßt, wobei die zusammengesetzten Antikörper einen unspezifischen IgM-Immunglobulinanteil aufweisen, der kovalent an einen spezifischen, nicht-IgM-Antikörper gebunden ist, der gegen einen spezifischen Infektionskrankheitswirkstoff gerichtet ist,

und (ii) eines markierten Detektormaterials

auf einen festen Träger,

wobei der feste Träger ein hieran immobilisiertes Bindungsmaterial aufweist, welches sich an die besagten zusammengesetzten Antikörper bindet und wobei sich das Detektormaterial des markierten Detektormaterials an die zusammengesetzten Antikörper bindet,

wobei ein Ternär-Komplex des besagten immobilisierten Bindungsmaterials, der besagten zusammengesetzten Antikörper und des besagten markierten Detektormaterials gebildet wird;

b) Entfernen von freiem markiertem Detektormaterial von dem festen Träger; und

c) Erhalten eines Ablesesignals durch Ermitteln des gebundenen oder des freien markierten Detektormaterials.

13. Verfahren nach Anspruch 12,

wobei sich das Bindungsmaterial, das an dem festen Träger immobilisiert festgelegt ist, an den unspezifischen IgM-Immunglobulinanteil der besagten zusammengesetzten Antikörper bindet und wobei sich das besagte Detektormaterial des markierten Detektormaterials an den besagten spezifischen, nicht-IgM-Antikörperanteil der zusammengesetzten Antikörper bindet.

14. Verfahren nach Anspruch 12,

wobei sich das Bindungsmaterial, das an dem besagten festen Träger immobilisiert ist, an den besagten spezifischen nicht-IgM-Antikörperanteil der besagten zusammengesetzten Antikörper bindet, und wobei sich das Detektormaterial des besagten markierten Detektormaterials an den unspezifischen IgM-Immunglobulinanteil der besagten zusammengesetzten Antikörper bindet.

15. Verfahren nach Anspruch 12,

wobei Schritt (a) das Applizieren der positiven Kalibrierungs- oder Kontrollzusammensetzung auf den festen Träger beinhaltet, das Inkubieren des festen Trägers und hierauf das Applizieren des markierten Detektormaterials auf den festen Träger.

16. Verfahren nach Anspruch 12, wobei Schritt (a) das Kombinieren der positiven Kalibrierungs- oder Kontrollzusammensetzung mit einer Lösung des

markierten Detektormaterials umfaßt, das Inkubieren der Mischung und hierauf das Applizieren der Mischung auf den festen Träger.

17. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Markierung des markierten Detektormaterials Mitglied der Gruppe ist, die aus fluoreszierenden Materialien, radioaktiven Materialien und Enzymen besteht.

18. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Markierung ein Enzym ist und Schritt (b) das Applizieren einer Lösung eines Trägermaterials für das Enzym auf den festen Träger umfaßt.

19. Verfahren zur Bestimmung eines Referenzsignal-Cut-Off-Wertes für einen Test hinsichtlich der Anwesenheit von Antikörpern für einen Infektionskrankheitswirkstoff, umfassend die Verfahrensschritte:

a) Applizieren (i) einer positiven Kalibrierungs- oder Kontrollzusammensetzung, die zusammengesetzte Antikörper umfaßt, wobei die zusammengesetzten Antikörper einen unspezifischen IgM-Immunglobulinanteil beinhalten, der kovalent an einen spezifischen nicht-IgM-Antikörper gebunden ist, welcher gegen einen spezifischen Infektionskrankheitswirkstoff gerichtet ist,

und (ii) eines markierten Detektormaterials,

auf einen festen Träger,

wobei der feste Träger ein hieran immobilisiertes Bindungsmaterial aufweist, welches sich mit den zusammengesetzten Antikörpern verbindet, und wobei sich das Detektormaterial des markierten Detektormaterials mit den zusammengesetzten Antikörper verbindet,

wobei ein Ternärkomplex gebildet ist aus dem immobilisierten Bindungsmaterial, den zusammengesetzten Antikörpern und dem markierten Detektormaterial;

b) Entfernen des freien markierten Detektormaterials von dem festen Träger;

c) Erhalten eines Ablesesignals durch Ermitteln des gebundenen oder freien markierten Detektormaterials; und

d) Verwenden des Ablesesignals bei der Bestimmung eines Referenzsignal-Cut-Off-Wertes.

0636886

1/1

23 11 00

